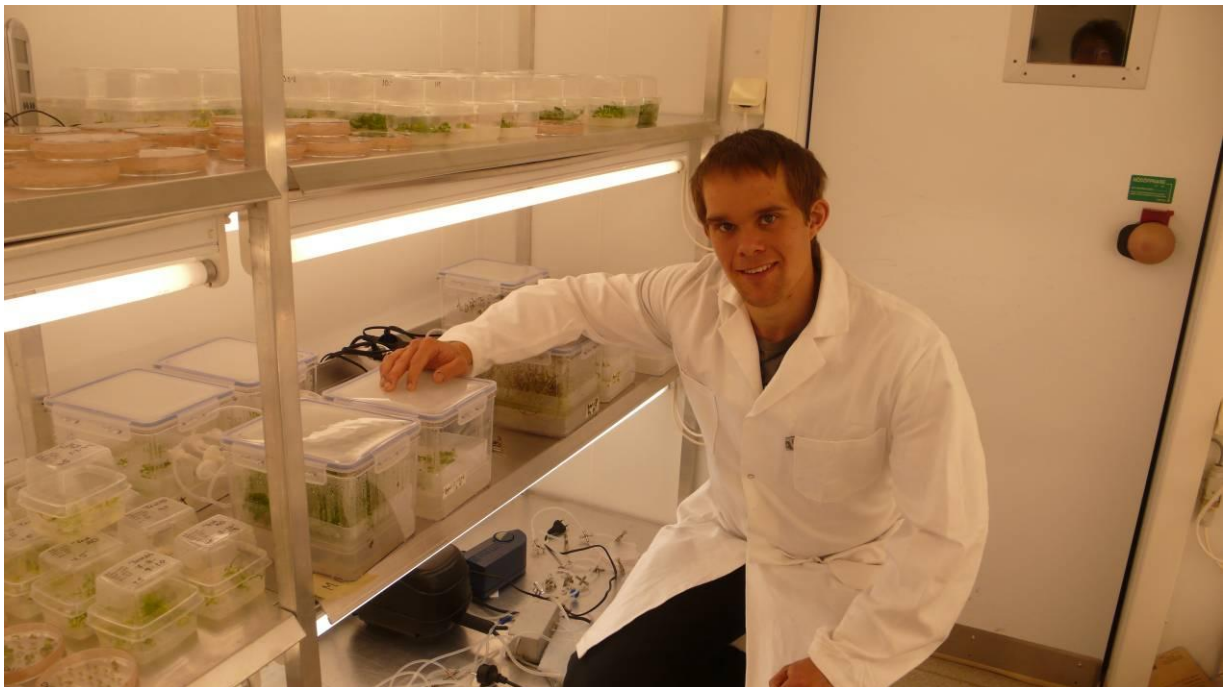


Storskalig mikroförökning av *Malus domestica*, *Solanum tuberosum* och *Rubus idaeus* i bioreaktorer

Large scale micropropagation of *Malus domestica*, *Solanum tuberosum* and
Rubus idaeus in bioreactors



Bioreaktorer med tillhörande pumpar för befuktning och luftning placerade i odlingskammare

Foto: Margareta Welanders

Av

Rikard Holst

SLU, Sveriges lantbruksuniversitet

LTJ-fakulteten vid området för växtförädling och bioteknik

Universitet SLU, Sveriges lantbruksuniversitet

Fakultet Landscape Planning, Horticulture and Agriculture

Område Växtförädling och bioteknik

Program Hortonomprogrammet

Författare Rikard Holst

Titel Storskalig mikroförökning av *Malus domestica*, *Solanum tuberosum* och *Rubus idaeus* i bioreaktorer

Engelsk titel Large scale micropropagation of *Malus domestica*, *Solanum tuberosum* and *Rubus idaeus* in bioreactors

Nyckelord mikroförökning, potatis, hallon, äpple, cytokinin, auxin, giberellinsyra, bioreaktor, agar

Handledare Professor Margareta Welanders, SLU, Område växtförädling och bioteknik

Examinator Dr Li-Hua Zhu, SLU, Område växtförädling och bioteknik

Kurstitel Examensarbete inom Hortonomprogrammet

Kurskod EX0369

Omfattning på arbetet i hp 15 hp

Ämne Biologi

Nivå Grundnivå C

Serienamn Självständigt arbete vid LTJ-fakulteten, SLU

Utgivningsort Alnarp

Utgivningsår 2011

Förord

Jag vill först och främst rikta ett stort tack till min handledare Margareta Welander för stöd och bra vägledning. Ett stort tack går också till Annelie Ahlman och Johanna Persson med flera för deras otroliga tålamod och överseende i sterilrum och laboratorium.

Jag vill även rikta ett stort tack till vänner för stöd och råd, inte att förglömma min familj som alltid trott på mig och inspirerat mig redan från barn.

Sist men absolut inte minst vill jag rikta ett tack till min Gud- Jesus Kristus. Tack vare Honom kan jag studera och beundra Hans fantastiska skapelse.

Innehållsförteckning

Förord	3
Abstract.....	5
Sammanfattning.....	5
Introduktion	6
Material och metoder.....	8
Växtmaterial	8
Odlingsmedier	8
Växthormoner.....	8
Mätningar	8
Bioreaktor	9
Sammansättning och autoklivering.....	10
Försöksbeskrivning.....	10
Potatisförsök	10
Hallonförsök	10
Äppleförsök	11
Statistiska beräkningar.....	11
Resultat och diskussion	12
Problem.....	12
Potatisförsök	12
Hallonförsök	17
Äppleförsök	20
Slutsats.....	24
Referenser	25
Appendix	27
Montering av bioreaktor	27

Abstract

The importance of micropropagation has increased to provide the increasing fields with true to type and healthy plants. Traditional plants are growing on solid agar-based medium but lately liquid medium has become a new opportunity.

This study has focused on a new bioreactor, developed on large scale micropropagation. Potato (*Solanum tuberosum* L. 'Semlo'), raspberry (*Rubus idaeus* L. 'Mormorshallon') and apple (*Malus domestica* Borkh. 'Rubinola') were used in the experiments in which shoot production and biomass production were studied at different concentrations of cytokinin, auxin and gibberelin. The results were compared with results from the same plant types grown on solid agar-based medium.

The results showed that the explants grown in liquid medium in bioreactors had higher multiplication rate of shoot production and in some cases also higher fresh weight and dry weight than explants growing on solid agar-based medium.

Sammanfattning

För att förse den allt ökande odlingsarealen med sortäkta, homogent, sjukdomsfritt växtmaterial har mikroförökningens betydelse ökat de senaste åren. Traditionellt har växter förökats på fast agarbaserat medium men på senare tid har odling på flytande medium blivit en ny möjlighet.

Denna studie har fokuserat på att undersöka en ny bioreaktor utvecklad för storskalig mikroförökning. Potatis (*Solanum tuberosum* L. 'Semlo'), hallon (*Rubus idaeus* L. 'Mormorshallon') och äpple (*Malus domestica* Borkh. 'Rubinola') har använts under försöken där skottproduktion och biomassproduktion undersökts vid olika koncentrationer av cytokinin, auxin och gibberelin. Resultaten jämfördes sedan med resultat från samma växtslag förökade på fast agarbaserade medier.

Resultaten visade att växtmaterial odlade på flytande medium i bioreaktorer hade en högre skottproduktion och i flera fall högre friskvikts- och torrviktsökning jämfört med växtmaterial odlade på fast agarbaserade medium.

Introduktion

Genom att använda mikroförökning kan sjukdomsfritt och sortäkta växtmaterial effektivt produceras (Welander 2011) men storskalig mikroförökning av ett homogent växtmaterial kan vara både svårt och kostsamt (Etienne & Berthouly 2002). Dagens teknik kräver ett stort antal små behållare med fast agarbaserat medium. Ett sådant begränsat system kräver också en kontinuerlig överföring av växtmaterial till nytt medium efter cirka 4-6 veckor på grund av bristande tillväxt på grund av den begränsade volymen (Maene & Debergh, 1985).

Enligt Etienne & Berthouly (2002) motsvarar arbetskostnaden cirka 40-60 % av totala produktionskostnaden. Beskärning och överföring av växtmaterialet utgör den kostsammaste delen i mikroförökning (Chu, 1995) men även tvättning, applicering samt handhavande av ett stort antal behållare kräver mycket arbete (Maene & Debergh, 1985). För att minska kostnaden för mikroförökning har en ny teknik utvecklats baserat på flytande näringslösning.

Bioreaktorer utvecklades först för etablering av bakteriekulturer och lämpades inte för mikroförökning på grund av vitrifiering (Debergh et al., 1981). För att undvika vitrifiering har en ny teknik utvecklats som baseras på flytande medium och bygger på TIS (Temporary Immersion System), (Etienne & Berthouly, 2002). Den första TIS-baserade bioreaktorn (RITA) utvecklades främst för somatisk embryogenes (Etienne et al., 1997) men kan även tillämpas vid mikroförökning av olika växtslag (Zhu et al., 2005).

Enligt Zhu et al., (2005) är fördelarna med bioreaktorer med flytande medium jämfört med agarbaserat medium: 1.) enklare att producera många identiska plantor; 2.) näringsupptagningen underlättas; 3.) bättre tillväxt och biomassproduktion på grund av luftning med hjälp av pumpsystem; 4.) minskande apikal dominans och stimulering av lateral skotttillväxt; 5.) tids- och arbetsbesparande.

Problemet med systemet är dock enligt Welander (2011) att in/utgångarna för luftningen sitter i locket vilket leder till att odlingskärnen inte är stapelbara. Separat ventilering är inte heller tillämpbar då enbart 2 in/utgångar för att trycksätta kärlet finns vilket i sin tur leder till att näringslösningen flyttas samtidigt med luftning.

En nyckelfaktor inom mikroförökning är förekomsten av tillväxthormon, särskilt auxin och cytokinin (Zimmermann, 1981). Ökad skotttillväxt uppnås bland annat genom minskad auxin-koncentration kombinerat med en ökad cytokinin-koncentration (Stasolla et al. 2002, Zimmermann, 1981). Hormoner produceras i en cell och styr cellprocesser i andra celler

genom att interagera med specifika proteiner som fungerar som receptorer (Taiz & Zeiger, 2010). Det första växthormonet som identifierades var enligt Taiz & Zeiger (2010) auxin. Auxin bildas ur en tryptofan-beroende biosyntes och en tryptofan-oberoende biosyntes (Normanly et al. 1995). Auxin bidrar bland annat till växttropism, cellelongering samt upprätthållande av apikal dominans (Taiz & Zeiger, 2010).

Cytokinin upptäcktes i samband med undersökning kring faktorer som stimulerar växters celledelning, senare visade det sig att cytokinin även förekommer i en mängd andra viktiga processer i växter som till exempel skottproduktion, rotinhibering, näringstransport samt vaskulär utveckling (Taiz & Zeiger, 2010). Cytokinin fungerar både vid långdistans-signalering samt kortdistans-signalering i växterna (Taiz & Zeiger, 2010).

Under försöken användes även Giberellinsyra. Enligt Hedden & Phillips (2000) är giberellinsyra mycket viktigt vid växters tillväxt, utveckling och främst sträckningstillväxt.

Huvudsyftet med examensarbetet har varit att arbeta med en nyutvecklad bioreaktor samt att optimera mikroförökningsförhållandet för potatis (*Solanum tuberosum* L. 'Semlo'), hallon (*Rubus idaeus* L. 'Mormorshallon') och äppel (*Malus domestica* Borkh. 'Rubinola'), genom att studera skillnader i förökningshastigheten och biomassproduktion vid olika hormonkoncentrationer samt att undersöka skillnader mellan flytande medium och fast medium.

Potatis, *Solanum tuberosum* L. tillhör växtfamiljen Solanaceae (Lagerberg, 1958.). Familjen består av örter och vedartade växter med strödda blad utan stipler. Blomställningen består vanligen av ett ensidigt knippe. Enligt Lagerberg (1958) karakteriseras solanacéerna av att många innehåller giftiga alkaloider som till exempel skopolamin, solanin, atropin och nikotin.

Matpotatis odlades under 2008 på ungefär 19 600 hektar och potatis för stärkelseframställning odlades på 7300 hektar (Björklund et al., 2010). Detta gav en skörd på 558 200 ton matpotatis, 295 000 ton stärkelsepotatis.

Hallon, *Rubus idaeus* L. Tillhör växtfamiljen Rosaceae (Lagerberg, 1958) växten klassas som en halvbuske som varje vår skickar upp bladförklädda, ogrenade och cirka 2 meter höga årsskott. Dessa skott överlever endast två vegetationsperioder och är enbart fertil under andra vegetationsperioden. Enligt Lagerberg (1958) förökas hallon dels med hjälp av fåglar vid fruktspridning men även den rikliga knoppbildningen från rötterna som leder till att hallonen ofta växer i täta och utbredda bestånd.

Under 2008 producerades 448 ton hallon i Sverige och utgör 4 % av den totala bärproduktionen (Johansson, 2010). Detta betyder att skörden av hallon och svarta vinbär är ungefär lika stora.

Enligt Johansson (2010) har hallon dock nästan 10 gånger högre produktionsvärde än svarta vinbär.

Äpple, *Malus domestica* Borkh. tillhör växtfamiljen Rosaceae (Lagerberg, 1958). Under 2008 producerades 22150 ton äpplen i Sverige som odlas på totalt 1432 hektar, vilket motsvarar fyra femtedelar av den totala fruktproduktionen (Jordbruksverket 2010).

Material och metoder

Växtmaterial

Vid försöken användes *Solanum tuberosum* L 'Semlo', *Rubus ideaus* L 'Mormorshallon' och *Malus domestica* Borkh. 'Rubinola'. Växtmaterialet förökades under tre veckor i bioreaktor med standardlösning före försökets start.

Odlingsmedier

I alla medier användes MS (Murashige & Skoog, 1962) och sackaros medan typ och koncentration av hormoner varierades. Vid potatisförsöken tillsattes 20 g sackaros/l i förökningsmediet. Vid hallon- och äppelförsöken tillsattes 30 g sackaros/l i förökningsmediet. Efter tillredning av medier justerades pH till 5,8 vid potatismedierna, 5,2 vid hallonmedierna samt 5,5 vid äpplemedierna.

Växthormoner

I försöken användes olika hormoner för att främja skottproduktionen och biomassproduktionen. Cytokinin användes i form av BA (benzyladenin). Auxin användes vid potatisförsöken i form av NAA (naftylättiksyra) och vid äppel- och hallonförsöken användes IBA (indolsmörtsyra). Vid potatisförsöken användes även giberellinsyra i form av GA₃.

Mätningar

Arbetet har mest fokuserat på skottproduktion och således har antalet utvecklade skott beräknats för varje växtslag och behandling. Utöver skottproduktionen har biomassproduktionen bestämts dels genom mätning av friskviktsförändringen samt genom mätning av torrviktsförändringen. Vid avläsningen noteras även ifall något explantat bildat rötter (>3mm). Vid mätningen av skottproduktion räknades varje utvecklat skott för att på så vis kunna beräkna skottproduktiviteten och förökningshastigheten.

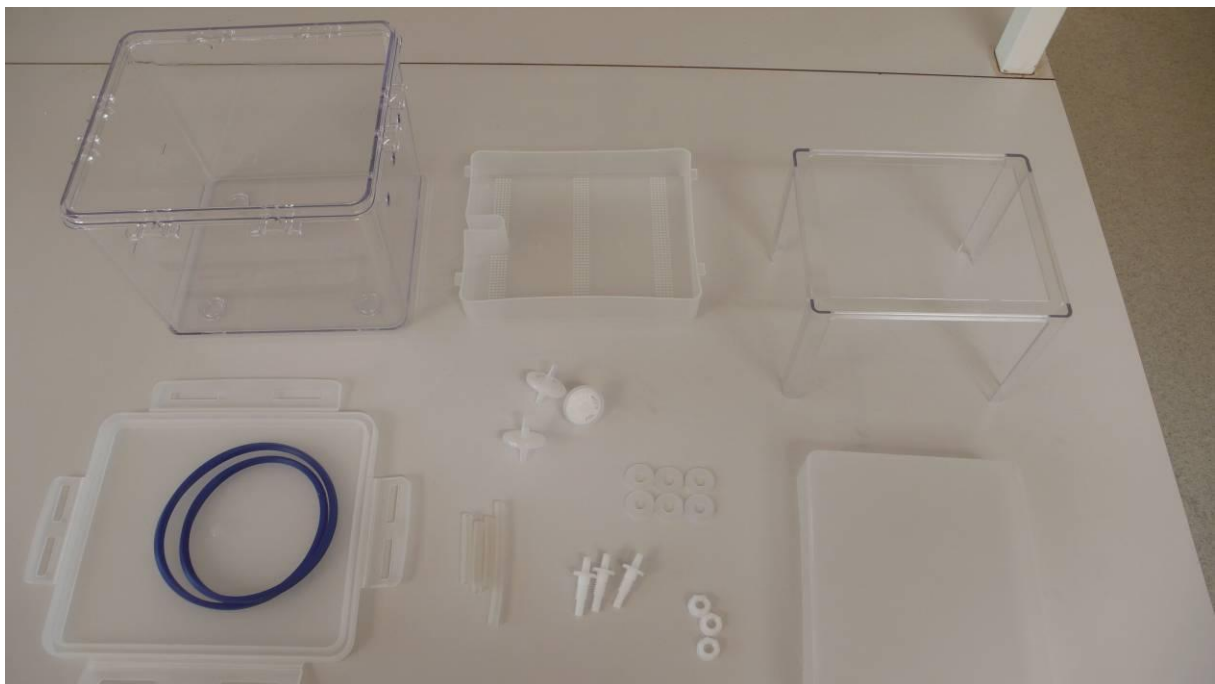
Vid potatisförsöket användes både noder och toppskott. Således beräknades både antalet noder och toppskott.

För att mäta biomassproduktionen mättes explantatet vid försökets start och mättes sedan åter vid försöksavlutningen. Därmed erhöles en skillnad i den totala biomassan, värdena kan sedan användas till att beräkna den totala biomassproduktionen.

Vid mätning av torrsubstansen torkades explantaten i cirka 24 timmar vid 70°C och vägdes därefter.

Bioreaktor

Växterna förökades i en ny utvecklad bioreaktor som baseras på TIS-tekniken (Temporary Immersion System)



Figur 1. Bioreaktorns olika beståndsdelar.

Bioreaktorerna placerades i en klimatkammare med 16 timmar dagsljus och temperatur på 23/18 °C (dag/natt) samt stödbelysning med ljusintensiteten 33 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Vid hallonförsöket placerades vissa bioreaktorer i en växthusavdelning för att studera huruvida detta skulle påverka förökningshastigheten och biomassproduktionen.

Befuktning och luftning kontrollerades av en styrenhet. Samtliga försök och växtslag befuktades 2 gånger/ dag under 2 minuter. Försöken luftades 1 gång/t under 3 minuter.

Sammansättning och autoklivering

Före försöksstarterna monterades bioreaktorerna som sedan torrautoklaverades under 20 minuter i 120 °C. Vid varje mediumtillverkning tillreddes enbart halva satser enligt vad recepten angav då recepten utgår från 1000 ml färdig lösning medan bioreaktorerna enbart rymmer 500 ml. Detta för att hushålla med dyra resurser och för att garantera att varje försök får lika mycket medium att utgå från.

Efter tillredning av medium autoklaverades lösningarna under 20 minuter i 120 °C och förvarades sedan svalt och mörkt i kylskåp.

Försöksbeskrivning

Potatisförsök

Vid potatisförsöken studerades skottproduktionen och tillväxthastigheten hos potatis samt eventuell rotbildning vid olika koncentrationer och kombinationer av GA₃ , BA och NAA enligt tabell 1 samt ett jämförande försök med fast agarbaserat medium.

Tabell 1. Växthormonerna som användes i potatisförsöken.

Behandling	GA ₃ (mg/l)	BA (mg/l)	NAA (mg/l)
1	0,5	0,5	0,01
2	0,1	1	0,01
3	0	0,5	0,01
4	0	1	0,01

Potatisexplantaten tillreddes genom att in vitroodlade potatisskott skars i bitar på 1 centimeter precis ovanför en nod. Bladet vid noden sparades på samtliga explantat. Både toppskott och noder användes i försöken med en jämnfördelning över samtliga försök och tillhörande replikat. Detta för att undvika missvisande resultat ifall eventuella skillnader i tillväxt mellan toppskott och sidoskott förekommer. Därefter vägdes 40 explantat/behandling och placerades i en bioreaktor under 4 veckor. För jämförande försök med fast agarbaserat medium användes 20 explantat. Samtliga behandlingar gjordes med två replikat.

Hallonförsök

Vid hallonförsöken studerades skottproduktionen och tillväxthastigheten hos hallon samt eventuell rotbildning vid olika koncentrationer och kombinationer av BA och IBA (indolsmörtsyra) enligt tabell 2 samt ett jämförande försök med fast agarbaserat medium.

Tabell2. Växthormonerna som användes i hallonförsöken.

Behandling	BA (mg/l)	IBA (mg/l)
1	0,5	0,01
2	1	0,01
3	2	0,01

Hallonexplantaten tillreddes på så vis att enbart toppskottet användes med få blad. 40 hallonexplantat/försök och behandling vägdes och placerades i en bioreaktor under 3 veckor. Vid jämförelsen med agar användes enbart 20 explantat/behandling. Samtliga behandlingar gjordes med två replikat.

Äppleförsök

Vid äppleförsöken studerades skottproduktionen och tillväxthastigheten samt eventuell rotbildning hos äpplesorten 'Rubinola' vid olika koncentrationer och kombinationer av BAP och IBA enligt tabell 3.

Tabell3. Växthormonerna som användes i äppleförsöken.

Behandling	BA (mg/l)	IBA (mg/l)
1	1	0,1
2	2	0,1
3	3	0,1

Äppelexplantaten tillreddes genom att äppleskott avbladades totalt med hjälp av en skalpell varpå de sedan delades strax ovanför varje nod och cirka 10 millimeter nedanför. På grund av brist på växtmaterial användes både toppskott och noder vid försöken men fördelades jämt på varje behandling av samma anledning som vid potatisförsöken.

30 äppelexplantat användes vid varje försök och behandling. På grund av brist på växtmaterial kunde inga jämförande försök med agarbaserat medium göras.

Statistiska beräkningar

Under de statistiska beräkningarna användes Minitab 16. För att finna några signifikanta skillnader mellan behandlingarna gjordes Tukey's och Fisher's test vid en envägs variansanalys (ANOVA) av värdena från bioreaktorerna. För att finna signifikanta skillnader mellan agarbaserat fast medium och flytande medium i bioreaktor gjordes Fisher's test vid en variansanalys (ANOVA- general linear model). Vid samtliga statistiska beräkningar användes signifikansgräns 5 %.

Resultat och diskussion

Problem

Under försöken drabbades några försök av kontaminering av systematisk karaktär. Försöken bedrevs ständigt med strikt försiktighet och noggrannhet kring explantaten i sterilt bänken. Problemet uppkom främst vid mätning av biomassproduktionen. Detta genomfördes genom att explantatens startvikt vägdes före de placerades i bioreaktorn alternativt på agarn. För att undvika uttorkning och påverkan av slutresultaten lades explantaten i sterilt vatten mellan beskärning av explantat och vägning vilket senare ledde till kontaminering då vattnet inte visade sig vara sterilt.



Figur 2. Olika infektioner av hallonkulturer i bioreaktorer.

Potatisförsök

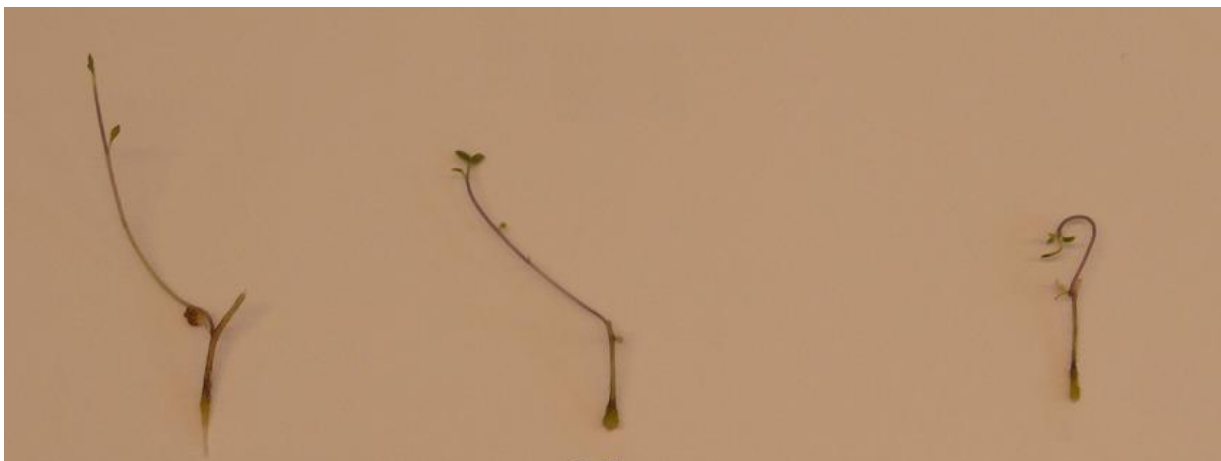
Resultaten av potatisförsöken varierade. Resultat från vissa behandlingar uteblev helt på grund av kontaminering. Resultat från behandling 2 i bioreaktorer uteblev helt samt behandling 4 på fast agarmedium men överlag tillväxte potatisexplantaten kraftigt i bioreaktorerna (Figur 3 och 4). Vid slutavläsningen iaktogs en lägre tillväxt hos potatisexplantaten från de fasta agarbaserade medierna (Figur 5).



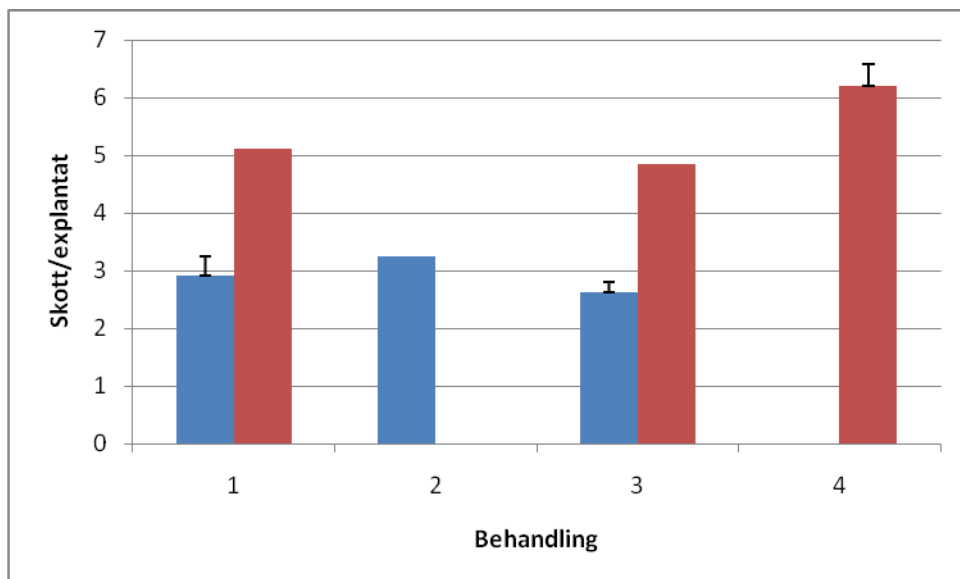
Figur 3. Potatiskulturer från bioreaktorer. Till vänster; Explantat vid försöksstart. Mitten; Behandling 1 (GA_3 : 0,5 mg/l, BA: 0,5 mg/l NAA: 0,01 mg/l.) vid slutavläsning. Till höger; Behandling 4 (BA: 1 mg/l, NAA:0,01 mg/l) vid slutavläsning.



Figur 4. Potatisexplantat från bioreaktorer vid slutavläsningen. Från vänster: Behandling 4: 1 mg/l BA, 0,01 mg/l NAA, Behandling 3: 0,5 mg/l BA, 0,01 mg/l NAA, Behandling 1: 0,5 mg/l GA_3 , 0,5 mg/l BA, 0,01 mg/l NAA, Behandling 4: 1 mg/l BA, 0,01 mg/l NAA.



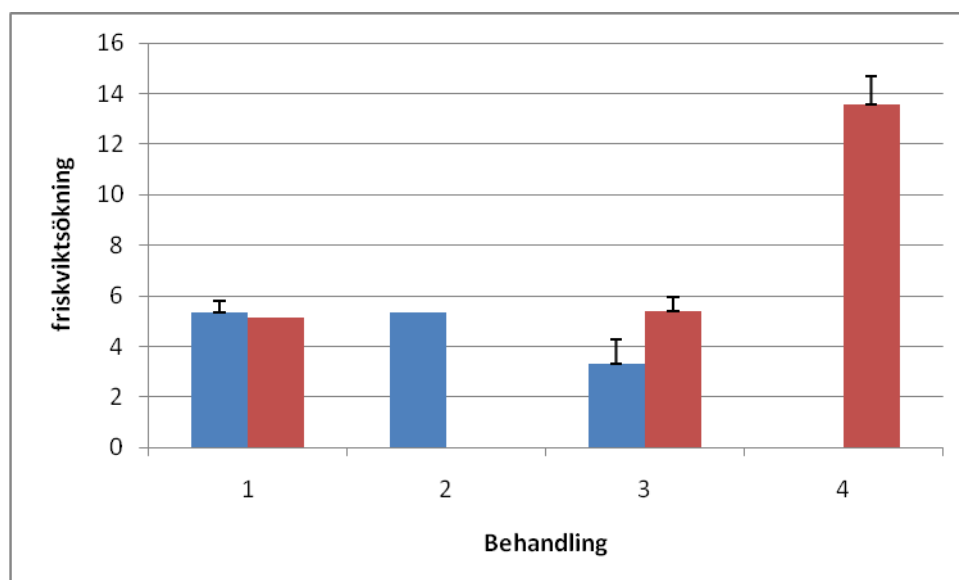
Figur 5. Potatisexplantat från fast agarmedium vid slutavläsningen. Från vänster: Behandling 1: 0,5 mg/l GA_3 , 0,5 mg/l BA, 0,01 mg/l NAA, Behandling 2: 0,1 mg/l GA_3 , 1 mg/l BA, 0,01 mg/l NAA, Behandling 3: 0,5 mg/l BA, 0,01 mg/l NAA.



Figur 6. Skottproduktion av potatis vid olika behandlingar. Behandling 1: 0,5 mg/l GA₃, 0,5 mg/l BA, 0,01 mg/l NAA. Behandling 2: 0,1 mg/l GA₃, 1 mg/l BA, 0,01 mg/l NAA. Behandling 3: 0,5 mg/l BA, 0,01 mg/l NAA. Behandling 4: 1 mg/l BA, 0,01 mg/l NAA. Röd=bioreaktor, Blå=agarmedium.

Skillnader i skottproduktionen presenteras i Figur 6. Diagrammet ger vissa indikationer på skillnader mellan flytande och fast medium. Metoderna kunde dock inte jämföras med ett statistiskt test på grund av få antal observationer. Däremot tenderade explantaten från bioreaktorerna ha bildat fler explantat/skott jämfört med explantaten från de fasta agarbaserade medierna.

För att jämföra behandlingarna genomfördes en envägs variansanalys (ANOVA) av behandlingarna från bioreaktorer. Detta gav dock ingen signifikans mellan behandlingarna ($p=0,064$).

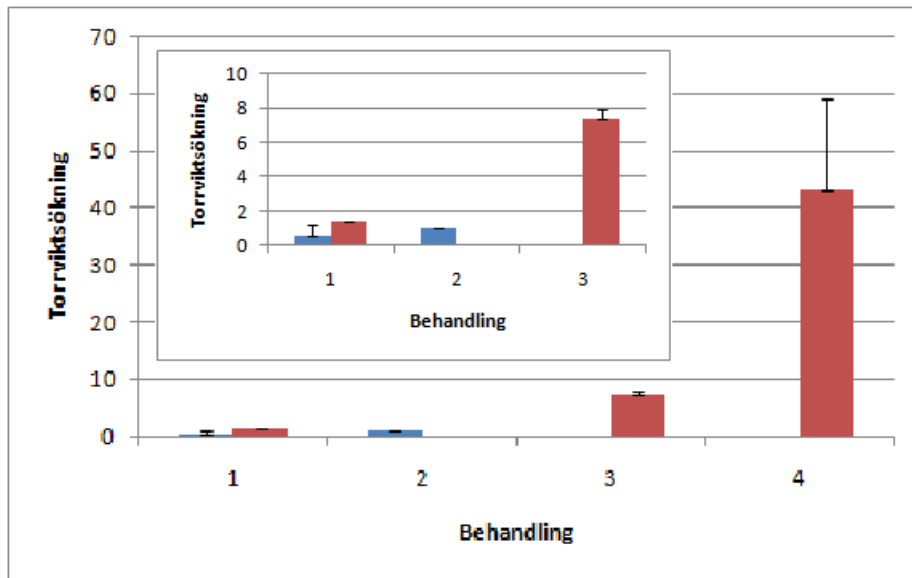


Figur 7. Friskviktsförändringen vid olika behandlingar. Behandling 1: 0,5 mg/l GA₃, 0,5 mg/l BA, 0,01 mg/l NAA. Behandling 2: 0,1 mg/l GA₃, 1 mg/l BA, 0,01 mg/l NAA. Behandling 3: 0,5 mg/l BA, 0,01 mg/l NAA. Behandling 4: 1 mg/l BA, 0,01 mg/l NAA.

Röd=bioreaktor,
Blå=agarmedium.

Friskvikten visade inga större skillnader mellan metoderna då de flesta behandlingarna ledde till en friskviktsökning på cirka 5 gånger. Vad som överraskade mest var behandling 4. Enligt Zhang et al. (2005) ökar friskvikten avsevärt mer vid tillsättning av GA₃ samt leder till kraftigare explantat. I detta försök ökade friskvikten med mer än det dubbla vid en högre koncentration av BA men i avsaknad av GA₃. Explantaten vid behandling 4 blev även kraftigare och inte så långsträckta som vid de andra behandlingarna (Figur 4).

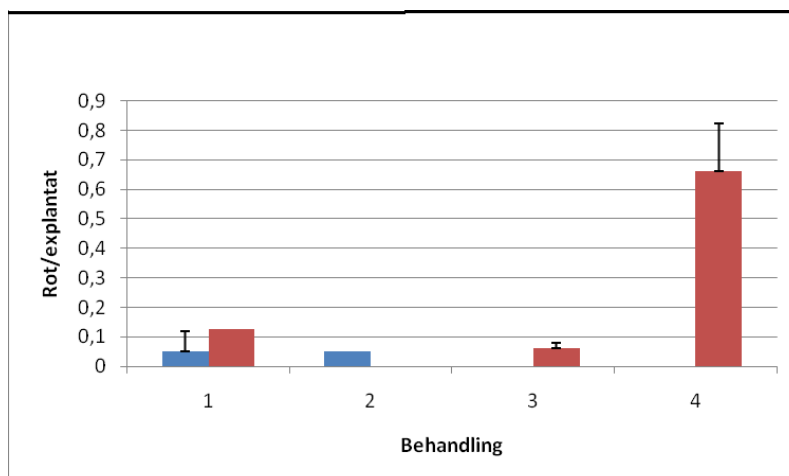
Vid envägs variansanalys visade Fisher's test att det fanns signifikanta skillnader mellan behandlingarna i bioreaktorerna ($p=0,019$) samt Tukey's test visade att behandling 4 signifikant var skilt åt från de andra behandlingarna. Testerna ska dock ses med försiktighet på grund av de få observationerna.



Figur 8. Torrviktsförändringen vid olika behandlingar. Behandling 1: 0,5 mg/l GA₃, 0,5 mg/l BA, 0,01 mg/l NAA. Behandling 2: 0,1 mg/l GA₃, 1 mg/l BA, 0,01 mg/l NAA. Behandling 3: 0,5 mg/l BA, 0,01 mg/l NAA. Behandling 4: 1 mg/l BA, 0,01 mg/l NAA.

Röd=bioreaktor, Blå=agarmedium.

Vid undersökning av skillnaden i torrs substans visades en tämligen liten förändring av torrs substans hos explantaten från agarmedierna medan explantaten från bioreaktorerna har en mycket högre ökning, dock med en högre standardavvikelse (Figur 8). Behandling 3 och 4 hade klart den högsta torr vikten. Detta kan förklaras vid att ingen GA₃ tillsattes vid dessa behandlingar. GA₃ leder enbart till cellsträckning medan cytokinin stimulerar celldelningen och den vaskulära utvecklingen samt attrahera mer näring vilket i sin tur leder till ökade friskvikt och torr vikt.



Figur 9. Rotbildningsfrekvens vid olika behandlingar. Behandling 1: 0,5 mg/l GA₃, 0,5 mg/l BA, 0,01 mg/l NAA. Behandling 2: 0,1 mg/l GA₃, 1 mg/l BA, 0,01 mg/l NAA. Behandling 3: 0,5 mg/l BA, 0,01 mg/l NAA. Behandling 4: 1 mg/l BA, 0,01 mg/l NAA.

Röd=bioreaktor, Blå=agarmedium.

Vid slutavläsningen noterades även ifall något explantat bildat rötter. Figur 9 visar andelen explantat/behandling som bildat rötter. Resultatet visar tydligt hur rotbildning står i nära med förhållandet mellan cytokininhalten och auxinhalten (Zimmermann, 1981; Taiz & Zeiger, 2010).

Hallonförsök

Figur 10 visar hallonexplantaten från bioreaktorerna vid slutavläsningen. Även hallonförsöken drabbades av kontaminering i samband med destillerat vatten, således erhöles enbart resultat från ett replikat från varje behandling och metod. Tillväxten var något lägre än förväntat och även vissa intorkade, tendens till gulaktiga explantat uppvisades. Detta var förmodligen ett resultat av hur känsliga hallon är för längre torka då plantorna låg i en delvis försluten tom plastskål mellan tillredning av explantaten och vägning innan de sedan placerades i odlingsmediet.



Figur 10. Överst till vänster; explantat vid försöksstart inuti bioreaktor. Överst till höger; Behandling 1: BA:0,5 mg/l, IBA: 0,01 mg/l vid slutavläsning. Nederst till vänster; Behandling 2: BA:1 mg/l, IBA: 0,01 mg/l vid slutavläsning. Nederst till höger; Behandling 3: BA: 2 mg/l, IBA: 0,01 mg/l vid slutavläsning.

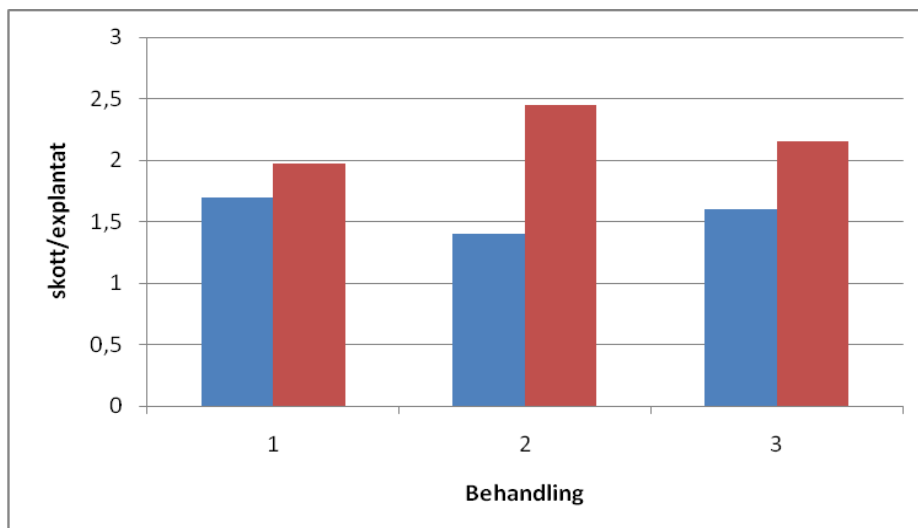


Figur 11. Hallonexplantat från bioreaktorer vid slutavläsning. Till vänster; Behandling 1: 0,5 mg/l BA, 0,01 mg/l IBA. Mitten; Behandling 2: 1 mg/l BA, 0,01 mg/l IBA. Till höger; Behandling 3: 2 mg/l BA, 0,01 mg/l.

Vid avläsningen iakttogs vissa skillnader mellan behandlingarna som tämligen väl stämde överens mellan de båda metoderna vilket figur 11 och 12 visar. Behandling 2 uppfattades ge något större och kraftigare skott.



Figur 12. Hallonexplantat från fast agarmedium vid slutavläsning. Till vänster; Behandling 1: 0,5 mg/l BA, 0,01 mg/l IBA. Mitten; Behandling 2: 1 mg/l BA, 0,01 mg/l IBA. Till höger; Behandling 3: 2 mg/l BA, 0,01 mg/l.



Figur 13 Explantatens skottproduktion vid olika behandlingar. Behandling 1: 0,5 mg/l BA, 0,01 mg/l IBA. Behandling 2: 1 mg/l BA, 0,01 mg/l IBA. Behandling 3: 2 mg/l BA, 0,01 mg/l IBA. **Röd**=bioreaktor, **Blå** =agarmedium.

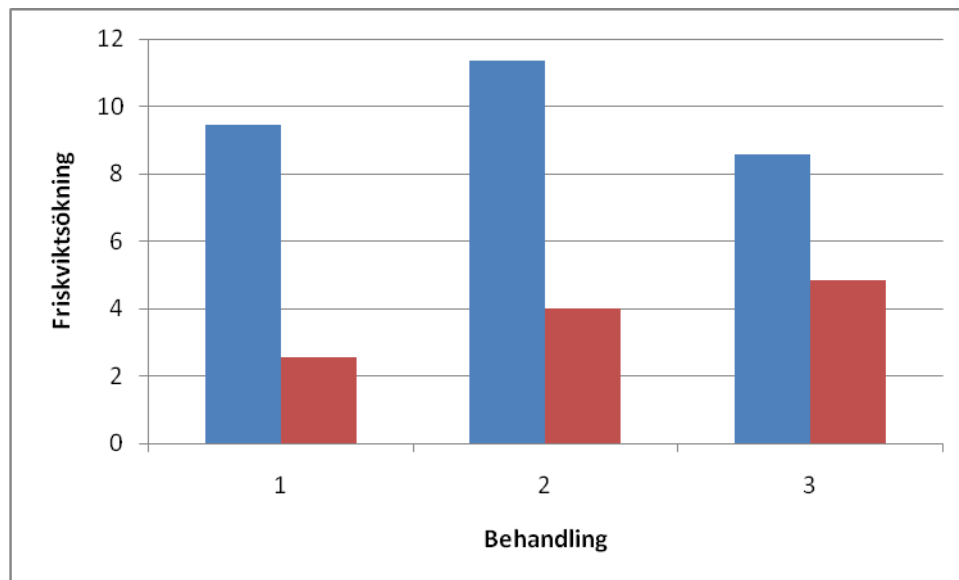
Skillnader i skottproduktion mellan behandlingarna presenteras i Figur 13. Resultatet gav vissa indikationer på skillnad i effektivitet i skottproduktion. Skillnaderna var dock inte lika stora

som vid potatisförsöken vilket kan tyda på att ingen direkt skillnad finns mellan skottproduktion av hallon på flytande medium jämfört med fast agarbaserat medium.

Variationsanalysen visade att det inte fanns någon signifikant skillnad mellan metoderna ($p=0,109$).

Enligt Zhu et al. (2005) ökar skottproduktionen med ökad hormonkoncentration vilket resultatet gav vissa antydningar till.

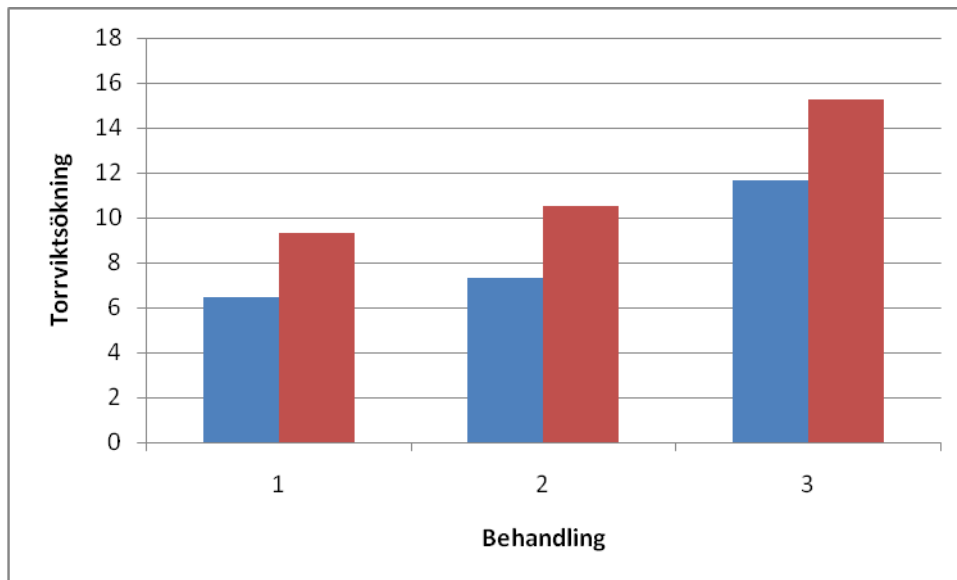
I framför allt behandling 2 gav bioreaktorerna fler skott jämfört med agarmedium detta visades dock inte i friskviktsökningen. Detta kan bero på att fler men mindre skott producerades.



Figur 14. Friskviktsförändringen vid olika behandlingar. Behandling 1: 0,5 mg/l BA, 0,01 mg/l IBA. Behandling 2: 1 mg/l BA, 0,01 mg/l IBA. Behandling 3: 2 mg/l BA, 0,01 mg/l IBA. Röd=bioreaktor, Blå=agarmedium.

Undersökning av förändringen av friskvikt uppvisade däremot större skillnader mellan metoderna. Friskvikten hade ökat mer vid explantaten odlade på agar än plantorna odlade i bioreaktorer.

Variationsanalysen visade heller ingen signifikant skillnad mellan hallonexplantat odlade på agarbaserade medier jämfört med hallonexplantat odlade på flytande medier i bioreaktorer ($p=0,939$). Resultatet bör dock tas med försiktighet då inga replikat fanns att tillgå. Vid friskviktsändringen ökade behandling 2 mest vid växtmaterialen odlade på agarbaserade medier medan behandlingarna i bioreaktorer ökade med ökad hormonkoncentration. Alvard et al. (1993) visade dock att olika växter har olika hormonsammansättningsoptimum vilket inte alltid leder till konstant ökad skottproduktion och biomassproduktion vid ökad hormonkoncentration vilket explantaten från de fasta agarbaserade medierna gav vissa indikationer på.



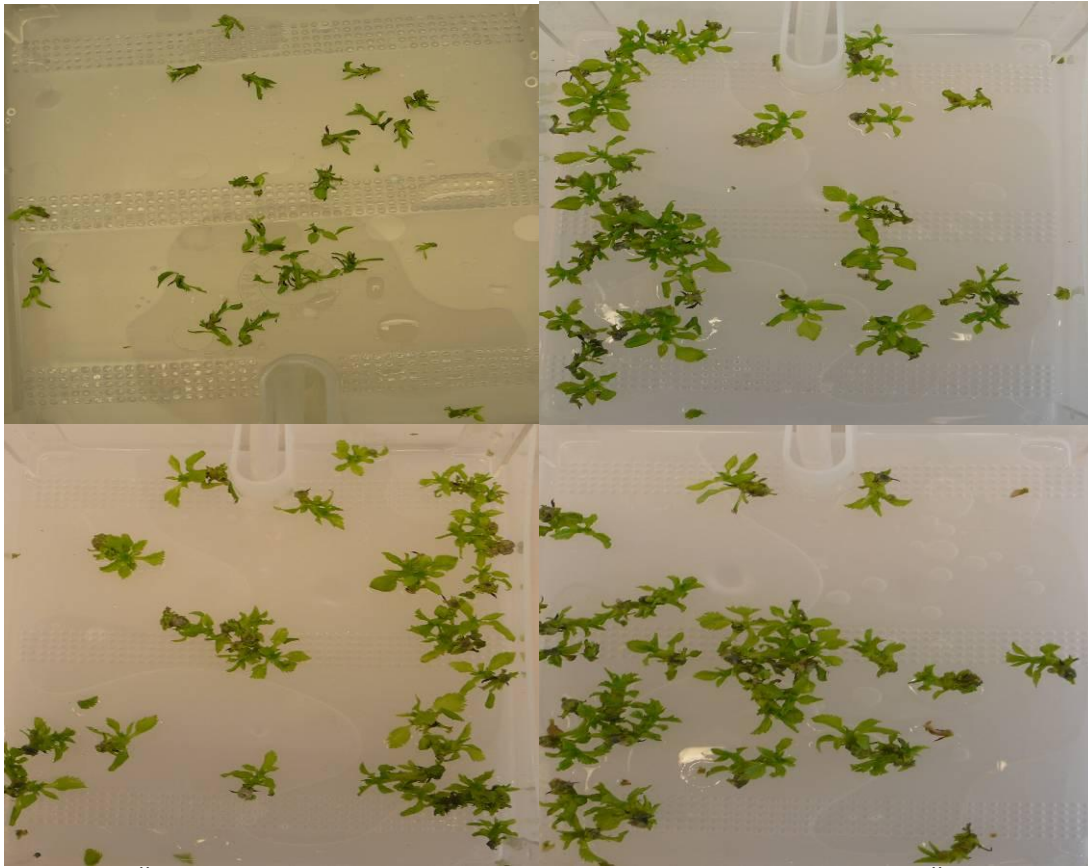
Figur 15. Torrviktsförändringen vid olika behandlingar. Behandling 1: 0,5 mg/l BA, 0,01 mg/l IBA. Behandling 2: 1 mg/l BA, 0,01 mg/l IBA. Behandling 3: 2 mg/l BA, 0,01 mg/l IBA. Röd=bioreaktor, Blå=agarmedium.

Vid bedömning av torrsubstansförändringen visades att vikten ökade med ökad hormonkoncentration vid båda metoderna. Detta ger vissa indikationer till att inte bara skottproduktionen ökar vid ökad hormonkoncentration utan även friskvikten och torrsubstansen något som explantat odlade på agarmedier gav tydligare indikationer på än explantat från flytande medier. Det borde dock finnas en korrelation mellan friskvikt och torrsvikt det vill säga större friskvikt borde leda till en större torrsvikt. Detta visas i behandling 3 men inte de övriga. Friskvikterna är osäkrare eftersom vatten kan följa med vid mätningarna i form av kondens på skotten. Likaså var det svårt att inte få med någon agar från de explantat som odlats på agarmedium vilket ger ett osäkrare resultat vid friskviktsmätningarna.

Alvard et al. (1993) visade dock att olika växter har olika hormonsammansättningsoptimum vilket inte alltid leder till konstant ökad skottproduktion biomassproduktion vid ökad hormonkoncentration.

Äppleförsök

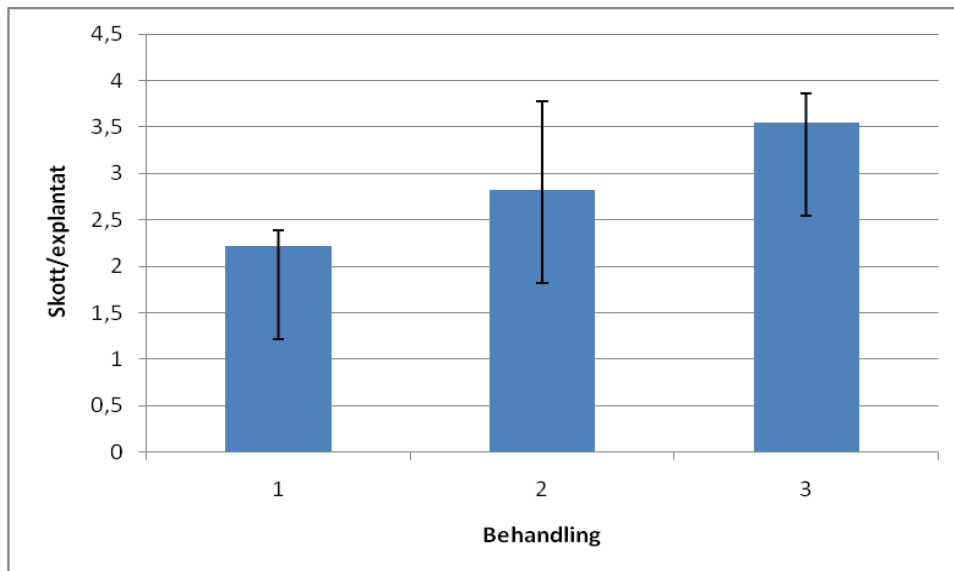
Äppelexplantaten hade en god tillväxt vid samtliga behandlingar vilket illustreras i figurerna 16 och 17. Gemensamt för samtliga tre behandlingar var bland annat att inga explantat utvecklade några rötter. Orsaken till utebliven rotbildning beror på flera anledningar. Vid motsvarande försök har äppelexplantat förökats i minst 7 veckor med olika medium samt ett rotningsmedium med mycket högre IBA-koncentration än vid dessa försök (Zhu et al. 2005). Vissa skillnader kunde dock åskådliggöras främst ur skottproduktionssynvinkel (Figur 18).



Figur 16. Överst till vänster; explantat vid försöksstart inuti bioreaktor. Överst till höger; Behandling 1: BA: 1 mg/l, IBA:0,1) vid slutavläsning. Nederst till vänster; Behandling 2: BA: 2 mg/l, IBA:0,1 mg/l vid slutavläsning. Nederst till höger; Behandling 3: BA: 3 mg/l, IBA: 0,1 mg/l vid slutavläsning.



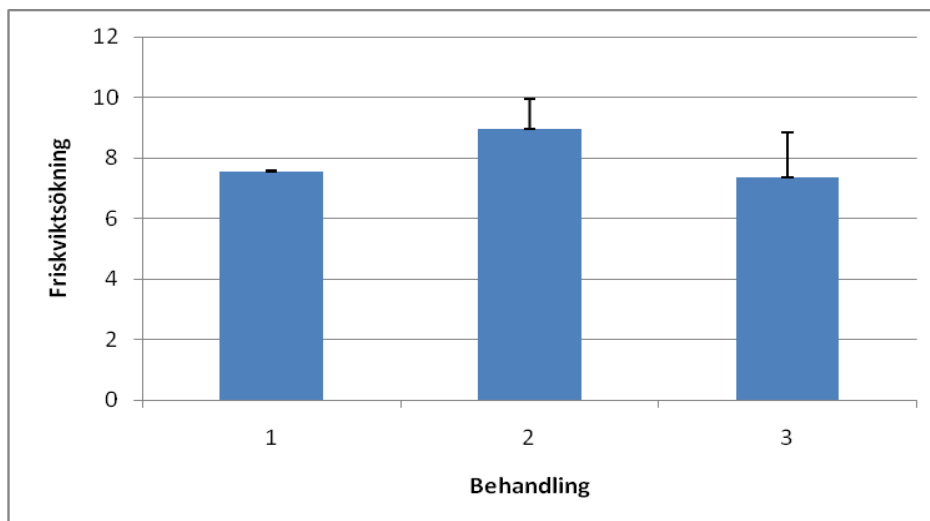
Figur 17. Äpplexplantat från bioreaktorer vid slutavläsning. Vänster; Behandling 1: BA: 1 mg/l, IBA:0,1 vid slutavläsning. Mitten; Behandling 2: BA: 2 mg/l, IBA:0,1 mg/l vid slutavläsning. Höger; Behandling 3: BA: 3 mg/l, IBA: 0,1 mg/l vid slutavläsning.



Figur 18. Explantatens skottproduktion vid olika behandlingar. Behandling **1**: 1 mg/l BA, 0,1 mg/l IBA. Behandling **2**: 2 mg/l BA, 0,1 mg/l IBA. Behandling **3**: 3 mg/l BA, 0,1 mg/l IBA.

Resultatet från bestämningen av skottproduktionen gav tydliga indikationer på att skottproduktionen ökar med ökad hormonkoncentration, dock uppvisades väldigt stora standardavvikelser mellan replikaten.

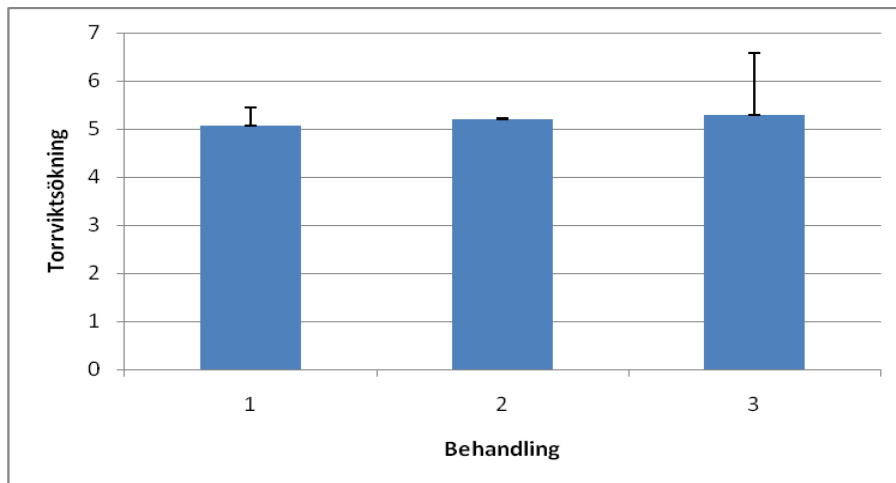
Vid envägs variansanalys visade Fisher's test ingen signifikant skillnad ($p=0,332$) mellan behandlingarna ur skottproduktionsaspekt.



Figur 19. Friskviktsförändringen vid olika behandlingar. Behandling **1**: 1 mg/l BA, 0,1 mg/l IBA. Behandling **2**: 2 mg/l BA, 0,1 mg/l IBA. Behandling **3**: 3 mg/l BA, 0,1 mg/l IBA.

Vid studien av friskviktsförändringen upptäcktes en kraftig ökning (figur 19). Ökningen var dock inte proportionell till hormonkoncentrationerna utan behandling 2 uppvisade den genomsnittligt högsta ökningen av friskviktsförändringen vilket kan bero på många mindre skott vid behandling 2.

Vid statistiska beräkningar av värdena upptäcktes inga signifikanta skillnader mellan behandlingarna ($p=0,759$).



Figur 20. Torrviktsförändringen vid olika behandlingar. Behandling **1**: 1 mg/l BA, 0,1 mg/l IBA. Behandling **2**: 2 mg/l BA, 0,1 mg/l IBA. Behandling **3**: 3 mg/l BA, 0,1 mg/l IBA.

Torrsubstansförändringen mellan behandlingarna visade också på en kraftig ökning men likväl ingen proportionalitet till hormonkoncentrationerna. Det borde dock även här finnas en korrelation mellan friskvikt och torrsvikt det vill säga större friskvikt borde leda till en större torrsvikt. Detta indikerar både behandling 2 och behandling 3. Friskvikterna är osäkrare eftersom vatten kan följa med vid mätningarna i form av kondens på skotten samt näringslösning från bioreaktorn.

De statistiska beräkningarna av värdena visade heller inga signifikanta skillnader mellan behandlingarna ($p=0,961$).

Slutsats

Resultaten visade tydligt hur växtmaterial kan styras till minsta detalj främst av hormonförhållanden. Detta visades främst vid potatisförsöken där behandling 4 klart visade sig vara den mest effektiva behandlingen ur skottproduktion och biomassproduktion.

Potatisförsöken visade också GA₃s effektivitet på sträckningstillväxt. Detta leder till att potatisexplantat effektivt kan styras från att hållas tillbaka som kompakta plantor till att öka stäckningstillväxten markant genom tillsättning av en relativt låg koncentration av GA₃.

Resultaten visade också tendenser på bioreaktorns effektivitet jämfört med agarbaserat medium främst ur skottproduktionsaspekter, vilket kunde iakttas över samtliga försök och växtmaterial. Torrviktsökning bör visserligen tas med viss försiktighet då enbart torrvikten från start kunde uppskattas och inte var ett exakt värde för samtliga behandlingar vilket kan orsaka vissa felmarginaler.

Odling av växtmaterial på flytande medium i bioreaktor har visat sig vara väldigt effektivt för storskalig produktion. Dessa är enkla att montera och handha. Vissa försök drabbades visserligen av kontaminering men detta är försumbart ur produktionssynvinkel då ingen kontaminering skett vid förökning av växtmaterialet utan enbart vid vissa försöksmoment som vägning och mätning av explantaten, vilket inte förekommer i produktion av växtmaterial. Vissa indikationer visade att förökning i bioreaktorer kan kräva högre hormonkoncentrationer för att uppnå det mest optimala förhållandet vilket potatisförsöken visade. Dock gav mikroförökning på flytande medium högre skottproduktion, friskviktsökning och torrviktsökning jämfört med fast agarbaserat medium.

Sammanfattningsvis visar detta arbete att odling på flytande medium i bioreaktor fortfarande är ett stort outforskat område, där detta arbete enbart berört ett mycket litet område. Försök behövs fortfarande inom olika befuktningstillfällen, sackaroskoncentrationer, sockersorter och flera olika hormonkoncentrationer samt näringsämnen..

Referenser

- Alvard, D., Cote, F. & Teisson C. (1993) *Comparison of methods of liquid medium for banana micropropagation-Effects of temporary immersion of explants*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 32. p. 55-60
- Björklund, I., Eklöf, P. & Renström, C. (2010). *Marknadsöversikt- vegetabilier*. Jönköping: Jordbruksverket. Rapportnummer: 4. ISRN: SJV-R-10/4-SE.
- Chu, I. (1995) *Economic analysis of automated micropropagation* . I: Aitken-Christie J, Kozai T & Smith MAL (eds) *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture* p. 19-26. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Debergh, P., Harbaoui, Y. & Lemeur, R. (1981) *Mass propagation of globe artichoke (Cynara scolymus) : evaluation of different hypothesis to overcome vitrification with special reference to water potential*. Physiol. Plant. 53 p. 181-187
- Maene, L. & Debergh P. (1985) *Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 5. p. 23-33
- Etienne, H. & Berthouly M. (2002) *Temporary immersion systems in plant micropropagation*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 69. p. 215-231
- Etienne, H., Lartaud, M., Michaux-Ferriere, N., Carron, M. P., Berthouly, M. & Teisson, C. (1997) *Improvement of somatic embryogenesis in Hevea brasiliensis (Müll. Arg) using the temporary immersion technique*. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 33 p. 81-87
- Hedden, P. & Phillips, A. L. (2000) *Giberellin metabolism: new insights revealed by the genes*. Trends in plant science Reviews 5. p. 523-530
- Johansson, K. (2010) *Marknadsöversikt- Färska frukter och grönsaker*. Jönköping: Jordbruksverket. Rapportnummer: 22. ISRN: SJV-R-10/22-SE.
- Lagerberg, T. (1958) *Vilda växter i Norden 3rd Edition*. Bokförlaget natur och kultur. Stockholm, Sverige
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962) *A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures*. Acta Physiologiae Plantarum. 15. p. 473-497
- Normanly, J., Slovin, J. P. & Cohen, J. (1995) *Rethinking Auxin Biosynthesis and Metabolism*. Plant Physiol. 107. p. 323-329
- Stasolla, C., Kong, L., Yeung, E. C. & Thorpe, T. A. (2002) *Maturation of somatic embryos in conifers: Morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology*. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. 38. p. 93-105
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2010) *Plant Physiology 5th Edition*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, USA

Welander, M. (2011) *Teknisk utveckling av bioreaktorer för storskalig mikroförökning av elitplantor*. Rapportserie: 2011:4. SLU Alnarp, institutionen för växtförädling och bioteknik.

Zhang, Z., Zhou, W. & Li. H. (2005) *The role of GA, IAA and BAP in the regulation of in vitro shoot growth and microtuberization in potato*. Acta Physiologiae Plantarum. 27. p. 363-369

Zhu, L-H., Li, X-Y. & Welander M. (2005) *Optimization of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 81. p. 313-318

Zimmermann R. H. (1981) *Micropropagation of fruit plants*. Acta Horticulturae. 120. p. 217-222

Appendix

Montering av bioreaktor



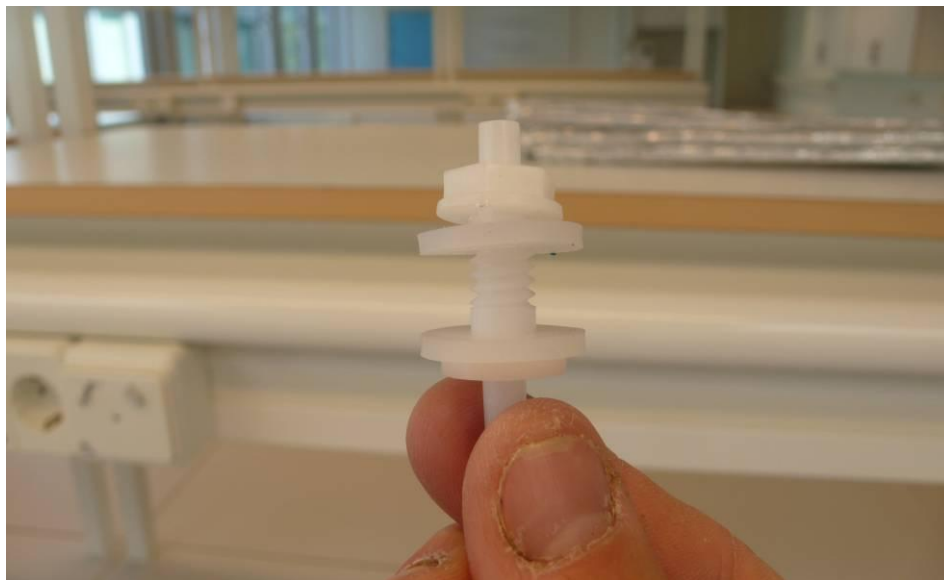
Bioreaktorn består av 1 st odlingskär, 1 st lock, 1 st silikonring för locket, totalt 4 st gummislangar varav 1 st längre för att kunna pumpa upp vätskan till explantaten, 3 st ventiler med tillhörande mutter samt 6 st gummipackningar för vardera sida, 1 st inre behållare med urgröpningar på sidorna, 1 st korg för växtmaterial, 1 st ram med fyra ben samt 3 st filter.



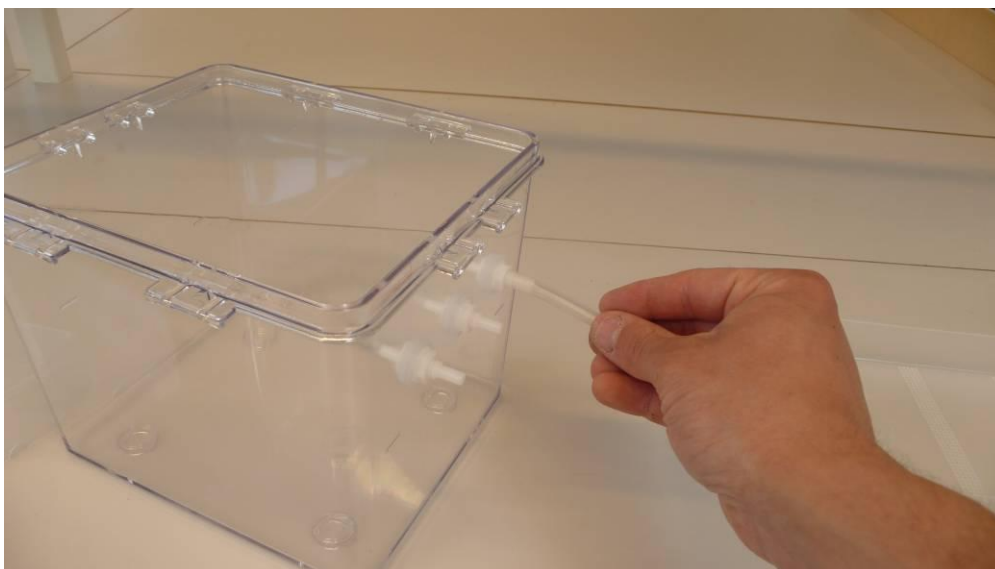
Packningen monterades lämpligast med ett kort eller mynt för att bioreaktorn skulle bli så tät möjligt.



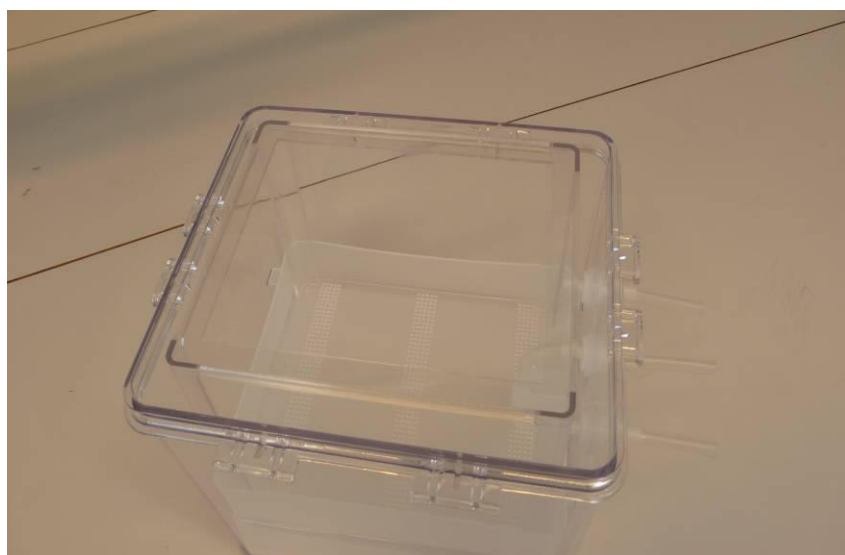
Den längsta gummislangen sattes sedan på underredet. Underredet placerades sedan i bioreaktorn varpå den andra slangändan fästes i den mittersta av ventilerna.



Varje ventil blev försedd med vars två stycken packningar och en mutter.



Ventilerna skruvades fast med handkraft i varje färdigborrat hål varpå de kortare slangarna monterades på ventilerna.



Därefter placerades explantatbehållaren och ställningen ovanpå underredet inuti bioreaktorn, varpå locket sedan kunde appliceras.



Slutligen sattes filterna på bioreaktorn, därefter var bioreaktorn redo för autoklivering och förökning av växtmaterial.